

NO

From: Marx, Irene  
 Sent: Wednesday, July 31, 2002 9:40 AM  
 To: STIC-ILL  
 Subject: 09/842637

406053

Please send to Irene Marx, Art Unit 1651; CM1, Room 10E05, phone 308-2922, Mail box in 11B01

DN 105:168806  
 TI Directed selection of differentiation mutants of Streptomyces noursei using chemostat cultivation  
 AU Noack, D.  
 CS Forschungsbereich Biowiss. Med., Dtsch. Akad. Wiss., Jena, DDR-6900, Ger.  
 Dem. Rep.  
 SO J. Basic Microbiol. (1986), 26(4), 231-9

FUNDAMENTAL STUDIES OF URINARY TRACT INFECTION WITH SERRATIA INTERACTION  
 BETWEEN BACTERIA OF DIFFERENT GENERA AND SPREADING OF R PLASMID TO  
 SERRATIA.

AU MASUC  
 CS DEP. UROL., HIROSHIMA UNIV. SCH. MED.  
 SO MED J HIROSHIMA UNIV, (1986) 34 (4), 453-472.  
 CODEN: HDIZAB. ISSN: 0018-2087.  
 FS BA; OLD  
 LA Japanese

Adaptive reversion of a frameshift mutation in Escherichia coli

AU Cairns, John; Foster, Patricia L.  
 CS Dep. Cancer Biol., Harvard Sch. Public Health, Boston, MA, 02115, USA  
 SO Genetics (1991), 128(4), 695-701  
 CODEN: GENTAE; ISSN: 0016-6731

BL - NO

TIC 8/1/02

TI Modification in penicillin-binding proteins during in vivo development of genetic competence of Haemophilus influenzae is associated with a rapid change in the physiological state of cells  
 AU Dargis, M.; Gourde, P.; Beauchamp, D.; Foiry, B.; Jacques, M.; Malouin, F.  
 CS Cent. Rech., Cent. Hosp., Ste-Foy, PQ, G1V 4G2, Can.  
 SO Infect. Immun. (1992), 60(10), 4024-31

I Decreased susceptibilities to teicoplanin and vancomycin among coagulase-negative methicillin-resistant clinical isolates of staphylococci

AU Sieradzki, Krzysztof; Villari, Paolo; Tomasz, Alexander  
 CS The Rockefeller University, New York, NY, 10021, USA  
 SO Antimicrobial Agents and Chemotherapy (1998), 42(1), 100-107

Triclosan and antibiotic resistance in Staphylococcus aureus

AU Suller, M. T. E.; Russell, A. D.  
 CS Pharmaceutical Microbiology, Welsh School of Pharmacy, Cardiff University, Cardiff, CF10 3XF, UK  
 SO Journal of Antimicrobial Chemotherapy (2000), 46(1), 11-18  
 CODEN: JACHDX; ISSN: 0305-7453

NO

TI Augmentation of antibiotic resistance in Salmonella typhimurium DT104 following exposure to penicillin derivatives

AU Carlson, S. A.; Ferris, K. E.  
 CS National Animal Disease Center, Pre-harvest Food Safety and Enteric Disease Research Unit, Agricultural Research Service, USDA, Ames, IA, USA  
 SO Veterinary Microbiology (2000), 73(1), 25-35

TI Augmentation of antibiotic resistance in Salmonella typhimurium DT104 following exposure to penicillin derivatives

## *Serratia* 尿路感染症の基礎的研究：複数菌における 菌種間の相互作用と *Serratia* への R 因子の伝播

柳 知果夫

広島大学医学部泌尿器科学教室（主任：仁平寛巳教授）

受付 昭和 61 年 5 月 24 日

*In vitro* で *Serratia* と *E. coli* との混合培養実験を行い、(1)菌の生息に影響を与える菌種間の相互作用、(2)臨床分離株の *Serratia* への R 因子の伝播、(3)R 因子の伝播に与える抗生物質の影響などについて検討して、下記の結果を得た。

(1) 異種菌種間の相互作用として、定常期にある菌種の細胞濃度が他菌種の増殖を抑制する。しかしその細胞濃度は、他菌種の増殖を停止させることはできない。すなわち異種菌種間では菌種間の相互作用を受けながら、それぞれ別の細胞集団として異なる増殖経過をたどる。

(2) 臨床分離株の *Serratia* への R 因子の伝達頻度は低く、経時的にみても R 変換菌の *Serratia* はあまり増加しなかった。さらに R 因子を持つ *Serratia* への新たな別の R 因子の伝達は、それらが不和合性であれば、R 変換菌が経時にみて減少していった。

(3) 混合培養中 R 変換菌の *Serratia* の菌数を経時的にみた場合、受容菌である *Serratia* が増殖の停止とした定常期の中を供与菌が増殖する場合と比較して、供与菌が定常期である中を *Serratia* が増殖する場合の方が、R 変換菌は明らかに多くなっていた。

(4) GM 含有培養液中では GM 感受性菌が死滅していき、そのため GM 耐性菌の増殖が良好となった。

(5) GM 含有培養液へ接種する GM 耐性 *Serratia* が 10 cells/ml 以下と少ない場合は、同時に接種する *Serratia* の菌量が 10<sup>7</sup> cells/ml 台と多ければ GM 耐性 *Serratia* が死滅する例が多く、*Serratia* の菌量が 10<sup>4</sup> cells/ml 台と少なければ生き残り増殖する例が多かった。

これらの結果より *Serratia* への R 因子の伝播を考えると、*Serratia* はそれ自体が薬剤耐性菌であり、抗生剤使用環境下で生き残ることができる。それゆえ R 因子保有菌と接する機会が多くなり、そこで *Serratia* への R 因子の伝播が生じるものと考えられる。R 因子を獲得し多剤耐性菌となつた *Serratia* は、また抗生剤の選択性に助けられて病院内で生き残り生息し、院内感染症の原因菌となるものと思われる。

尿路感染症の起炎菌は、*E. coli* をはじめとする腸内細菌などの常在菌叢に属するものがほとんどである。尿路に基礎疾患がない単純性尿路感染症の起炎菌としては、*E. coli* の分離頻度が圧倒的に多いことはよく知られている。これは宿主の防御能の破綻度が少なく、強毒性とされている *E. coli* などしか定着できないためと考えられる<sup>26)</sup>。しかし尿路に基礎疾患がある複雑性尿路感染症では、尿路に存在する局所的感染防御能は低下している状態であり、尿路に弱毒菌群も容易に侵入し定着できることになり、その起炎菌の多

様化が起こると考えられる。また同時にそれらの理由で複数菌感染も多く認められることになる<sup>28, 51)</sup>。

*Serratia* はこれら尿路感染症の起炎菌として多く分離され、病院内感染の原因菌として重要な問題となっている<sup>1, 13, 23, 28, 43, 45, 57, 60)</sup>。*Serratia* は薬剤耐性菌が多く、それら耐性菌の中には R 因子を持っているものが多いとされている<sup>10, 22, 30, 48, 54, 59)</sup>。R 因子は腸内細菌および *P. aeruginosa* などから高率に検出され、極めて容易に相互の菌種間に伝播される<sup>15, 25, 39, 42, 47, 53)</sup>。腸管内は多数の腸内細菌を含んでおり、R 因子の伝播があ

ることはよく知られている<sup>3, 14, 40, 41</sup>。しかし *Serratia* は腸管内にはほとんど定着しないとされており<sup>28, 45</sup>, *Serratia* への R 因子の伝播は腸管外での伝播が主たるものと考えられる。*Serratia* は尿中からよく分離される訳であるから、*Serratia* への R 因子の伝播は尿路内で生じる可能性は十分あると思われる。すなわち尿路内に *Serratia* を含む複数菌が存在していて、一方の菌種が R 因子を保有する場合、接合伝達により *Serratia* が R 因子を受け取り多剤耐性菌となることは十分に考えられる。

しかし R 因子の伝播に関与するこれら複数菌の生息には、宿主側の因子とともに菌種間の相互作用、抗菌剤の投与などが強く影響を与えると考えられる。また臨床分離株の *Serratia* への R 因子の伝達は、表面排斥、不和合性、制限現症などその菌が持つ R 因子の伝達を阻害する因子のため、その伝達頻度は低いものと考えられる。すなわち尿路内の R 因子の伝播は、それを受けとる臨床分離株の *Serratia* 自体の問題と、それら尿路に存在する菌種間の相互作用、抗生素投与などにより影響を受けることが考えられる。

本研究は *in vitro* で *Serratia* と *E. coli* の混合培養実験を行い、(1)菌種間の相互作用、(2)臨床分離株の *Serratia* への R 因子の伝播経過、(3)それら R 因子の伝播に与える抗生素の影響などの 3 点について検討したものである。

### 実験材料および実験方法

#### 1. 使用菌株

##### a. 混合培養に用いた使用菌株

*Serratia* は *Serratia* H38, *Serratia* H38RKM の 2 菌株を使用した。*Serratia* H38 は広島大学医学部附属病院泌尿器科で分離された臨床分離株で、*E. coli* C (rif<sup>r</sup>) に抗菌作用を示す bacteriocin 産生能を有する。gentamicin (GM) には感受性菌であり、R 因子は保有していない。*Serratia* H38RKM は、*Serratia* H38 に kanamycin (KM), neomycin (NM) 耐性 R 因子(以下 KM 耐性 R 因子と略称)を接合伝達させることにより得られた株で、KM 耐性 R 因子を保有する *Serratia* H38 株である。この菌種は GM には感受性菌である。

*E. coli* は *E. coli* C tol SH38, *E. coli* C tol SH38RGM の 2 菌株を使用した。*E. coli* C tol SH38 は、rifampicin (RF) 耐性的 *E. coli* C (rif<sup>r</sup>) の変異株で、*Serratia* H38 が産生する bacteriocin に対して耐性を示す。*E. coli* C tol SH38RGM は、*E. coli* C tol SH38 に carbenicillin (CBPC), gentamicin (GM),

dibekacin (DKB), kanamycin (KM), neomycin (NM) 耐性 R 因子(以下 GM 耐性 R 因子と略称)を接合伝達することにより得られた株で、GM 耐性 R 因子を保有する *E. coli* C tol SH38 株である。

#### b. その他の使用菌株

*E. coli* は RF 耐性的 *E. coli* C (rif<sup>r</sup>) を、*Serratia* は *Serratia* H38RGM を使用した。*Serratia* H38RGM は、*E. coli* C tol SH38RGM より *Serratia* H38 に GM 耐性 R 因子を接合伝達することにより得られた株で、GM 耐性 R 因子を保有する *Serratia* H38 である。

#### 2. 使用菌株の薬剤感受性試験

薬剤感受性検査は、使用菌株の 6 菌株に関して行った。使用薬剤として tetracycline (TC), chloramphenicol (CP), sulfonamide (SA), streptomycin (SM), carbenicillin (CBPC), gentamicin (GM), dibekacin (DKB), kanamycin (KM), neomycin (NM), polymyxin B (PL-B), rifampicin (RF) の 11 種類を使用した。

薬剤感受性検査法は日本化療法学会最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法に準じて<sup>33</sup>、10<sup>6</sup> cells/ml 接種にて測定した。測定用培地としては Mueller Hinton (MH) agar (Difco 社) を使用した。被検菌株を MH broth (Difco 社) で 37°C, 18 時間培養した菌液を 10<sup>6</sup> cells/ml になるよう調製し、ミクロプランターを用いて薬剤含有寒天平板上に接種し、37°C, 18 時間培養後の菌の発育の有無をもって判定した。

#### 3. 使用菌株の bacteriocin 産性能の検討

Traub らの方法<sup>55</sup>に準じ、mitomycin C 誘発法により各種菌株の bacteriocin 産性能を検討した。すなわち各種菌株を Trypticase soy (TS) agar (栄研) 平板に分離、33°C, 18 時間培養後に、一つの colony を選び TS broth (栄研) 2.5 ml に接種して、33°C で 6 時間培養した。その培養液 2 ml を TS broth 7 ml に接種し、TS broth 液を 9 ml として 33°C で 2 時間培養した。10 µg/ml の mitomycin C 液を 1 ml 加え (mitomycin C の最終濃度は 1 µg/ml), 33°C で 8 時間培養した。その培養液にクロロホルム 1 ml を入れて 20 回強く振盪し、1,000 g, 10 分間遠心し、その上清液を取り出しこれを bacteriocin 液とした。一方各種菌株を TS broth で 33°C, 18 時間培養し、その 10<sup>-3</sup> 希釈液を TS agar 平板上に 2 ml 注加、余分をただちに吸い取って乾燥後、bacteriocin 液 0.05 ml を滴下し、33°C, 18 時間培養後その発育阻止を観察して判定した。

#### 4. 選択平板と各種菌株の生菌数の測定

各種菌株の生菌数の測定は、選択平板を用いて平板

培養法で行った。選択平板の培地として BTB agar (栄研) を使用した。

各種菌株の選択平板として、*E. coli* の測定用選択平板は RF 25 µg/ml 含有の BTB agar, *Serratia* の測定用選択平板は PL-B 12.5 µg/ml 含有の BTB agar を使用した。混合培養にて GM 耐性 R 因子を受け取り GM 耐性菌となった *Serratia* (以下 GM 耐性 *Serratia* と略称) の測定用選択平板は、PL-B 12.5 µg/ml と GM 6.25 µg/ml 含有の BTB agar を使用した。

選択平板の有効性を検討するため、Heart Infusion (HI) broth (栄研) で 37°C, 18 時間培養した各種菌株の培養液を適当に希釈して、その一定量を通常の BTB 平板とその選択平板に塗抹し、37°C, 18 時間培養後それぞれの平板に発生する colony を数えて比較検討した。また各種菌株の選択平板における他菌種の発育阻止効果を検討した。すなわち各種選択平板に、HI broth で 37°C, 18 時間培養した他菌種の培養液を 0.1 ml 塗抹し、37°C, 18 時間培養後に発生する colony を数えた。

各種菌株の生菌数の測定は、それぞれの選択平板を用いて、培養液の原液あるいは適当な希釈液の 0.1 ml を選択平板に塗抹し、37°C, 18 時間培養後に発生する colony を数えて、生菌数を測定した。ただし培養液の原液 0.1 ml を選択平板に塗抹し、37°C, 18 時間培養後に全く colony 形成が認められない場合は、その生菌数は 10 cells/ml 以下で測定不能であるが、計算上は 1 log cells/ml として計算した。

### 5. 混合培養実験

#### a. 単独培養、混合培養時の *Serratia*, *E. coli* の増殖経過

細菌の増殖が混合培養中では菌種間の相互作用として、どのような影響を受けるかを検討する目的で *Serratia*, *E. coli* の増殖経過を単独培養と混合培養において観察した。

使用菌株は *Serratia* H38, *E. coli* C tol SH38 を使用した。HI broth で 37°C, 18 時間培養した *Serratia* H38, あるいは *E. coli* C tol SH38 を、単独培養では HI broth に 10<sup>2</sup> cells/ml 接種、混合培養ではそれに加えて他菌種 10<sup>7</sup> cells/ml を接種して、37°C, 24 時間静置培養し、接種後 6, 12, 24 時間目に各菌種の生菌数を測定しその増殖経過をみた。

#### b. GM 感受性菌の *Serratia* (*Serratia* H38, *Serratia* H38RKM) と、GM 耐性 R 因子を保有する *E. coli* C tol SH38RGM との混合培養実験

臨床分離株の *Serratia* への R 因子の伝播経過と、

それら R 因子の伝播に与える抗菌剤の影響をみる目的で、臨床分離株の *Serratia* を受容菌として混合培養実験を行い、*Serratia* への R 因子の伝播経過をみた。

供与菌としては GM 耐性 R 因子を保有する *E. coli* C tol SH38RGM を使用し、受容菌としては GM 荘剤感受性菌の *Serratia* H38, *Serratia* H38RKM の 2 種類を使用した。HI broth で 37°C, 18 時間培養した供与菌と受容菌を各種の組み合わせ (供与菌 10<sup>7</sup> cells/ml + 受容菌 10<sup>7</sup> cells/ml, 供与菌 10<sup>7</sup> cells/ml + 受容菌 10<sup>3</sup> cells/ml, 供与菌 10<sup>3</sup> cells/ml + 受容菌 10<sup>7</sup> cells/ml) で HI broth に混合接種し、37°C, 6 時間静置培養して、この培養液を HI broth あるいは GM 含有の HI broth で 10 倍希釈した。すなわちこの培養液 1 ml を、一方は通常の HI broth 9 ml に接種、もう一方は GM 含有の HI broth 9 ml (最終 GM 濃度が 100 µg/ml) に接種して、それ 37°C, 24 時間静置培養した。供与菌である *E. coli*, 受容菌である *Serratia*, および GM 耐性 R 因子を受けとった GM 耐性 *Serratia* の各菌種の生菌数の測定は、混合接種後 6 時間目、10 倍希釈後 6, 12, 24 時間目に行い、それらの各菌種の経時的な変動をみた。

## 成績

### 1. 使用菌種の薬剤感受性 (Table 1)

#### a. 各種 *Serratia* の薬剤感受性

*Serratia* H38 は CBPC に対して高度耐性菌であったが、aminoglycoside 系薬剤に対しては感受性菌であった。*Serratia* H38RKM は KM 耐性 R 因子を保有するため、当然のことながら KM, NM に対して高度耐性菌となっていた。しかし GM に対しては、*Serratia* H38 と同様に感受性菌であった。*Serratia* H38RGM は GM 耐性 R 因子を保有するため、当然 GM, DKB, KM, NM などに対して高度耐性菌となっていた。これら *Serratia* の 3 菌株とも PL-B に対して高度耐性菌であり、RF に対して感受性菌であった。

#### b. 各種 *E. coli* の薬剤感受性

*E. coli* C (rif) と *E. coli* C tol SH38 に対する各種薬剤の MIC は全く同じ値であり、この両菌株は SA, RF 以外は各種薬剤に対して感受性菌であった。*E. coli* C tol SH38RGM は GM 耐性 R 因子を保有するため、当然 CBPC, GM, DKB, KM, NM などに対して高度耐性菌となっていた。これら *E. coli* の 3 菌株とも RF に対して高度耐性菌であり、PL-B に対して感受性菌であった。

### 2. 使用菌株の bacteriocin 産性能 (Table 2)

*Serratia* の各種菌株の bacteriocin 液は *E. coli* C

Table 1. Antibiotic sensitivity of *Serratia* and *E. coli* strains

Strains	MIC(μg/ml)											
	TC	CP	SA	SM	CBPC	GM	DKB	KM	NM	PL-B	RF	
<i>Serratia</i> H38	50	12.5	100	6.25	>1600	0.78	6.25	3.13	1.56	>400	6.25	
<i>Serratia</i> H38RKM	50	12.5	100	6.25	>1600	0.78	6.25	1600	400	>400	6.25	
<i>Serratia</i> H38RGM	50	12.5	100	6.25	>1600	100	>100	1600	400	>400	6.25	
<i>E. coli</i> C (rif)	6.25	3.13	100	0.78	3.13	0.2	0.39	0.39	0.78	3.13	>400	
<i>E. coli</i> C tol SH38	6.25	3.13	100	0.78	3.13	0.2	0.39	0.39	0.78	3.13	>400	
<i>E. coli</i> C tol SH38RGM	6.25	3.13	100	0.78	800	50	100	200	100	3.13	>400	

Antibiotics: TC; tetracycline, CP; chloramphenicol, SM; streptomycin, CBPC; carbenicillin, GM; gentamicin, DKB; debekacin, KM; kanamycin, NM; neomycin, PL-B; polymyxin B, RF; rifampicin.

(rif) に対して抗菌力を示したが、*E. coli* C tol SH38 と *E. coli* C tol SH38RGM に対しては抗菌力を示さなかった。*E. coli* C tol SH38 と *E. coli* C tol SH38RGM の bacteriocin 液は、*E. coli* C (rif) に對

して抗菌力を示さなかった。すなわち *Serratia* の各種抗株は、ある種の bacteriocin 産生能を有する菌種であるが、*E. coli* C tol SH38 と *E. coli* C tol SH38RGM は、*Serratia* の各種菌株が产生する bacteriocin に耐性菌となっているが、それ自体はその bacteriocin 産生能を有しない菌種であった。

### 3. 選択培地の検討

各種菌液の希釈液の一定量を通常の BTB 平板とその選択平板にそれぞれ塗抹して分離培養したが、その colony 数は両平板で特に差がなかった (Table 3)。このことは選択平板では、その菌種の colony 数を減少することはないと考えられ、これによって正確な生菌数が測定できると判定される。

各種選択平板における他菌種の発育抑制効果を検討した (Table 4)。*E. coli* の測定用選択平板における各種 *Serratia* の colony 数は、各菌株の場合とも全て 10 以下であった。*Serratia* の測定用選択平板での各種 *E. coli* の colony 数は、全て 10 以下であった。BTB 平板では乳糖分解菌の *E. coli* は黄色の colony を形成し、非分解菌の *Serratia* は無色の colony を形成す

Table 2. Bacteriocin producing ability of *Serratia* and *E. coli* strains

Bacteriocin	Bacteriocin sensitivity					
	S1	S2	S3	E1	E2	E3
S1	—	—	—	+	—	—
S2	—	—	—	+	—	—
S3	—	—	—	+	—	—
E1	—	—	—	—	—	—
E2	—	—	—	—	—	—
E3	—	—	—	—	—	—

+: sensitive to respective bacteriocin

-: resistant to respective bacteriocin

Strains: S1; *Serratia* H38,

S2; *Serratia* H38RKM, S3; *Serratia* H38RGM,

E1; *E. coli* C (rif), E2; *E. coli* C tol SH38,

E3; *E. coli* C tol SH38RGM.

Table 3. Comparison between BTB agar and selective plate at colony count of each strain

Strains	No. of colonies of each strain at each agar plate (mean±S.D., n=5)			
	BTB agar Plate	PL-B plate	PL-B, GM plate	RF plate
<i>Serratia</i> H38	139±26	146±13		
<i>Serratia</i> H38RKM	159±28	139±6		
<i>Serratia</i> H38RGM	146±13		139±6	
<i>E. coli</i> C tol SH38	123±10			123±4
<i>E. coli</i> C tol SH38RGM	89±18			85±12

Selective plate

PL-B plate: BTB agar with 12.5 μg of polymyxin B per ml.

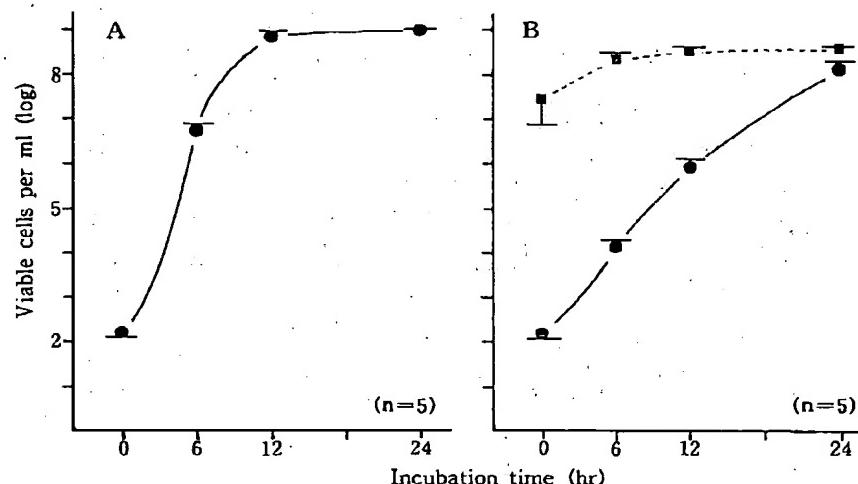
PL-B, GM plate: BTB agar with 12.5 μg of polymyxin B per ml and 6.25 μg of gentamicin per ml.

RF plate: BTB agar with 25 μg of rifampicin per ml.

Table 4. Ability of selective plate to arrest growth of other strains

Selective plate	Strains (0.1 ml of over night culture broth)	No. of colonies (mean $\pm$ S. D., n=5)
RF plate	<i>Serratia</i> H38	3 $\pm$ 3
	<i>Serratia</i> H38RKM	3 $\pm$ 2
	<i>Serratia</i> H38RGM	3 $\pm$ 3
PL-B plate	<i>E. coli</i> C tol SH38	1 $\pm$ 1
	<i>E. coli</i> C tol SH38RGM	2 $\pm$ 2
PL-B, GM plate	<i>Serratia</i> H38	0 $\pm$ 0
	<i>Serratia</i> H38RKM	0 $\pm$ 0

## Selective plate

RF plate: BTB agar with 25  $\mu$ g of rifampicin per ml.PL-B plate: BTB agar with 12.5  $\mu$ g of polymyxin B per ml.PL-B, GM plate: BTB agar with 12.5  $\mu$ g of polymyxin B per ml and 6.25  $\mu$ g of gentamicin per ml.Fig. 1. Growth curve of *Serratia* in single and mixed culture A: single culture, B: mixed culture.Symbols: ●; *Serratia* H38, ■; *E. coli* C tol SH38

るので、肉眼的に両者の識別が容易である。すなわち各種選択平板では他菌種は抑制されほとんど増殖できない状態であり、たとえ増殖してもそれは10以下と分離した colony を形成するのみである。それら colony は容易に識別できる訳であるから、選択平板でその生菌数を測定するのに特に支障はないと考えられる。

GM 耐性 *Serratia* の測定用選択平板では、GM 感受性の *Serratia* H38, *Serratia* H38RKM は全く colony 形成がなかった。このことは逆にその選択平板で colony を形成する *Serratia* は GM 耐性 *Serratia* と考えられ、GM 耐性 *Serratia* の測定用選択平板に生じた *Serratia* の colony 数を GM 耐性 *Serratia*

の生菌数として測定した。

## 4. 混合培養実験の成績

a. 単独培養、混合培養における *Serratia*, *E. coli* の増殖経過

1) *Serratia* の増殖経過 (Fig. 1)

単独培養における *Serratia* の増殖経過は、接種時その生菌数は平均  $2.24 \pm 0.17$  log cells/ml, 6 時間目で  $6.69 \pm 0.19$  log cells/ml, 12 時間目で  $8.82 \pm 0.08$  log cells/ml, 24 時間目で  $8.93 \pm 0.10$  log cells/ml と経時的に増殖し、12 時間目すでに定常期に達していた (Fig. 1, A)。

混合培養における *Serratia* の増殖経過は、接種時

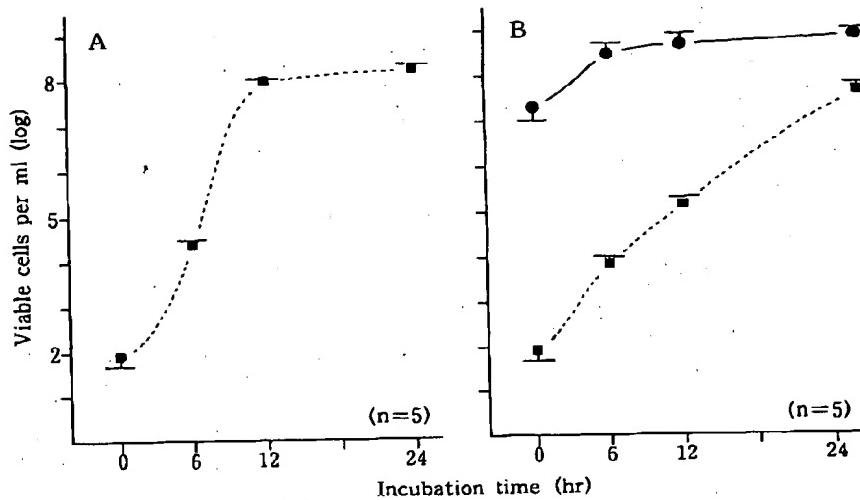


Fig. 2. Growth curve of *E. coli* in single and mixed culture A: single culture, B: mixed culture.

Symbols: ●; *Serratia* SH38, ■; *E. coli* C tol SH38

その生菌数は平均  $2.24 \pm 0.17$  log cells/ml, 6時間目で  $4.12 \pm 0.24$  log cells/ml, 12時間目で  $5.85 \pm 0.19$  log cells/ml, 24時間目で  $8.07 \pm 0.18$  log cells/ml と経時に増殖したが、単独培養と比較して明らかにゆるやかな増殖曲線を示していた。一方の *E. coli* は接種時その生菌数は平均  $7.43 \pm 0.67$  log cells/ml で、6時間目に  $8.29 \pm 0.23$  log cells/ml とほぼ定常期に達していた (Fig. 1, B)。

### 2) *E. coli* の増殖経過 (Fig. 2)

単独培養における *E. coli* の増殖経過は、接種時その生菌数は平均  $1.91 \pm 0.22$  log cells/ml, 6時間目で  $4.26 \pm 0.25$  log cells/ml, 12時間目で  $7.86 \pm 0.19$  log cells/ml, 24時間目で  $8.16 \pm 0.17$  log cells/ml と経時に増殖した (Fig. 2, A)。

混合培養における *E. coli* の増殖経過は、接種時その生菌数は平均  $1.91 \pm 0.22$  log cells/ml, 6時間目で  $3.89 \pm 0.15$  log cells/ml, 12時間目で  $5.13 \pm 0.17$  log cells/ml, 24時間目で  $7.65 \pm 0.12$  log cells/ml と経時に増殖したが、単独培養と比較して明らかにゆるやかな増殖曲線を示していた。一方の *Serratia* は接種時その生菌数は平均  $7.25 \pm 0.25$  log cells/ml で、6時間目に  $8.44 \pm 0.31$  log cells/ml とほぼ定常期に達していた (Fig. 2, B)。

これらの成績を要約してみると、*Serratia* および *E. coli* の増殖経過は、それぞれ単独培養と比較して、他菌種がほぼ定常期にある混合培養中では両者ともに

増殖速度は明らかに遅延していた。しかしその増殖は停止することなく、培養24時間目で  $10^8$  cells/ml 前後まで増殖していった。

b. GM 感受性菌の *Serratia* (*Serratia* H38, *Serratia* H38RKM) と、GM 耐性 R 因子を保有する *E. coli* C tol SH38RGM との混合培養実験

#### 1) HI broth における混合培養

##### a) 受容菌として *Serratia* H38 を使用した混合培養

(1) *Serratia* H38  $10^7$  cells/ml + *E. coli*  $10^7$  cells/ml の混合接種(以下 S'E' 接種と略称)の場合 (Fig. 3): *Serratia* の増殖経過は、混合接種時その生菌数は平均  $6.76 \pm 0.23$  log cells/ml、混合接種後 6 時間目で  $8.36 \pm 0.15$  log cells/ml と定常期近くの菌数に達していた。10倍希釈後の経過は、希釈後 6 時間目でその生菌数は平均  $8.31 \pm 0.14$  log cells/ml、12時間目で  $8.66 \pm 0.16$  log cells/ml、24時間目で  $8.71 \pm 0.16$  log cells/ml と希釈後はゆるやかな増殖曲線を示し、希釈後12時間目までに定常期に達していた。

*E. coli* の増殖経過は、混合接種時その生菌数は平均  $6.88 \pm 0.08$  log cells/ml、混合接種後 6 時間目で  $8.31 \pm 0.15$  log cells/ml と定常期の菌数に達していた。10倍希釈後の経過は、希釈後 6 時間目でその生菌数は平均  $7.94 \pm 0.11$  log cells/ml、12時間目で  $8.26 \pm 0.21$  log cells/ml、24時間目で  $8.18 \pm 0.23$  log cells/ml と希釈後はゆるやかな増殖曲線を示し、希

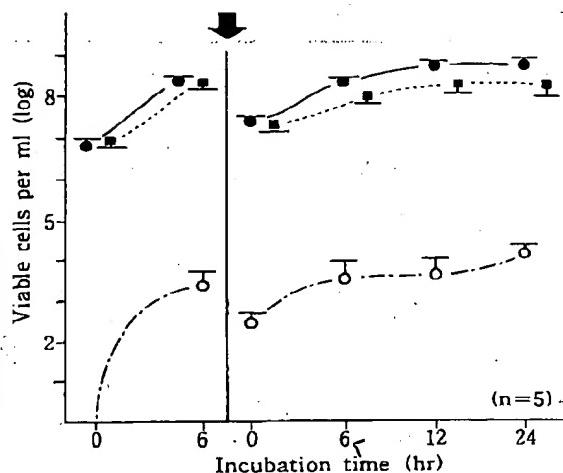


Fig. 3. GM resistant R plasmid transfer between *Serratia* H38 and *E. coli* C tol SH38RGM in HI broth (inoculum size: *Serratia* H38  $10^7$  cells/ml, *E. coli*  $10^7$  cells/ml).

Symbols:  $\blacktriangle$ ; 10-fold dilution with HI broth,  $\bullet$ ; *Serratia* H38,  $\circ$ ; GM resistant *Serratia*,  $\blacksquare$ ; *E. coli* C tol SH38RGM.

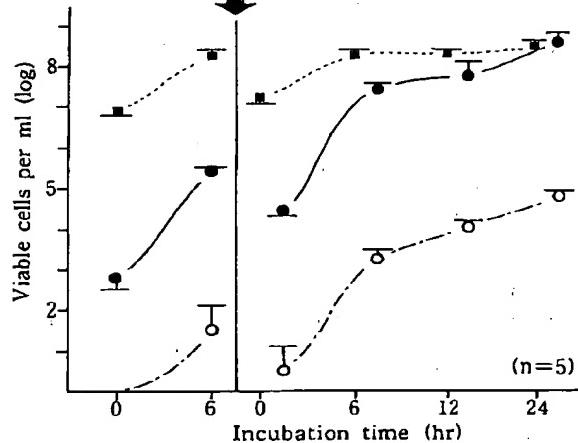


Fig. 4. GM resistant R plasmid transfer between *Serratia* H38 and *E. coli* C tol SH38RGM in HI broth (inoculum size: *Serratia* H38  $10^3$  cells/ml, *E. coli*  $10^7$  cells/ml).

Symbols:  $\blacktriangle$ ; 10-fold dilution with HI broth,  $\bullet$ ; *Serratia* H38,  $\circ$ ; GM resistant *Serratia*,  $\blacksquare$ ; *E. coli* C tol SH38RGM.

希釈後12時間目までに定常期に達していた。

GM 耐性 *Serratia* の経時的な変化は、混合接種後6時間目でその生菌数は平均  $3.39 \pm 0.28$  log cells/ml 認められた。10倍希釈後の経過は、希釈後6時間目でその生菌数は平均  $3.61 \pm 0.34$  log cells/ml, 12時間目で  $3.55 \pm 0.46$  log cells/ml, 24時間目で  $4.09 \pm 0.15$  log cells/ml と経時的な増加は軽度であった。

(2) *Serratia* H38  $10^3$  cells/ml + *E. coli*  $10^7$  cells/ml の混合接種(以下 S<sup>3</sup>E<sup>7</sup> 接種と略称)の場合 (Fig. 4): *Serratia* の増殖経過は、混合接種時その生菌数は平均  $2.76 \pm 0.23$  log cells/ml, 混合接種後6時間目で  $5.41 \pm 0.09$  log cells/ml と  $10^3$  cells/ml 台の菌数に達していた。10倍希釈後の経過は、希釈後6時間目でその生菌数は平均  $7.46 \pm 0.09$  log cells/ml, 12時間目で  $7.74 \pm 0.36$  log cells/ml, 24時間目で  $8.66 \pm 0.19$  log cells/ml と経時的に増殖したが、希釈後6時間目以降はゆるやかな増殖曲線を示し、希釈後12時間目でも定常期の菌数に達していなかった。

*E. coli* の増殖経過は、混合接種時その生菌数は平均  $6.88 \pm 0.08$  log cells/ml, 混合接種後6時間目で  $8.24 \pm 0.18$  log cells/ml と定常期の菌数に達していた。10倍希釈後の経過は、希釈後6時間目でその生菌数は平均  $8.80 \pm 0.10$  log cells/ml と定常期の菌数に達していた。

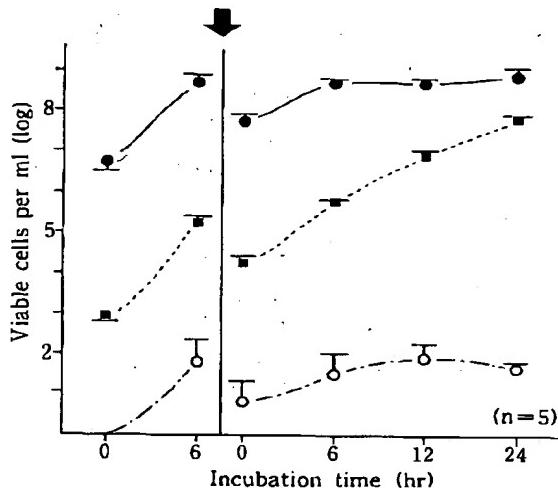


Fig. 5. GM resistant R plasmid transfer between *Serratia* H38 and *E. coli* C tol SH38RGM in HI broth (inoculum size: *Serratia* H38  $10^7$  cells/ml, *E. coli*  $10^3$  cells/ml).

Symbols:  $\blacktriangle$ ; 10-fold dilution with HI broth,  $\bullet$ ; *Serratia* H38,  $\circ$ ; GM resistant *Serratia*,  $\blacksquare$ ; *E. coli* C tol SH38RGM.

数は平均  $8.28 \pm 0.09$  log cells/ml と定常期に達していた。

GM 耐性 *Serratia* の経時的な変化は、混合接種後 6 時間目でその生菌数は平均  $1.48 \pm 0.61$  log cells/ml 認められた。10倍希釈後の経過は、希釈後 6 時間目でその生菌数は  $3.23 \pm 0.22$  log cells/ml, 12 時間目で  $3.98 \pm 0.07$  log cells/ml, 24 時間目で  $4.75 \pm 0.12$  log cells/ml と *Serratia* の増殖とほぼ同調して経時に増殖した。

(3) *Serratia* H38  $10^7$  cells/ml + *E. coli*  $10^3$  cells/ml の混合接種(以下 S'E<sup>3</sup> 接種と略称)の場合 (Fig. 5): *Serratia* の増殖経過は、混合接種時その生菌数は平均  $6.76 \pm 0.23$  log cells/ml, 混合接種後 6 時間目で  $8.69 \pm 0.14$  log cells/ml と定常期の菌数に達していた。10倍希釈後の経過は、希釈後 6 時間目でその生菌数は平均  $8.71 \pm 0.09$  log cells/ml と定常期に達していた。

*E. coli* の増殖経過は、混合接種時その生菌数は平均  $2.88 \pm 0.08$  log cells/ml, 混合接種後 6 時間目で  $5.23 \pm 0.13$  log cells/ml と  $10^5$  cells/ml 台の菌数に達していた。10倍希釈後の経過は、希釈後 6 時間目で

その生菌数は平均  $5.71 \pm 0.11$  log cells/ml, 12 時間目で  $6.89 \pm 0.12$  log cells/ml, 24 時間目で  $7.72 \pm 0.22$  log cells/ml とゆるやかな増殖曲線を示し、希釈後 24 時間目でも定常期の菌数に達していなかった。

GM 耐性 *Serratia* の経時的な変化は、混合接種後 6 時間目でその生菌数は  $1.80 \pm 0.55$  log cells/ml 認められた。10倍希釈後の経過は、希釈後 6 時間目でその生菌数は  $1.53 \pm 0.49$  log cells/ml, 12 時間目で  $1.93 \pm 0.33$  log cells/ml, 24 時間目で  $1.62 \pm 0.20$  log cells/ml であり、希釈後 12 時間目までは供与菌の *E. coli* の増殖経過に伴なって GM 耐性 *Serratia* は増殖した。しかしそれ以後は、*E. coli* が増殖しているにもかかわらず GM 耐性 *Serratia* は一定の状態であり、経時的な増加は認めなかった。

b) 受容菌として *Serratia* H38RKM を使用した混合培養

(1) *Serratia* H38RKM  $10^7$  cells/ml + *E. coli*  $10^7$  cells/ml の混合接種(以下 SK'E<sup>7</sup> 接種と略称)の場合 (Fig. 6): *Serratia*, *E. coli* のそれぞれの増殖経過は、S'E<sup>7</sup> 接種の場合とほぼ同様の増殖経過を示した。

GM 耐性 *Serratia* の経時的な変化は、混合接種後 6 時間目でその生菌数は平均  $1.84 \pm 0.09$  log cells/ml

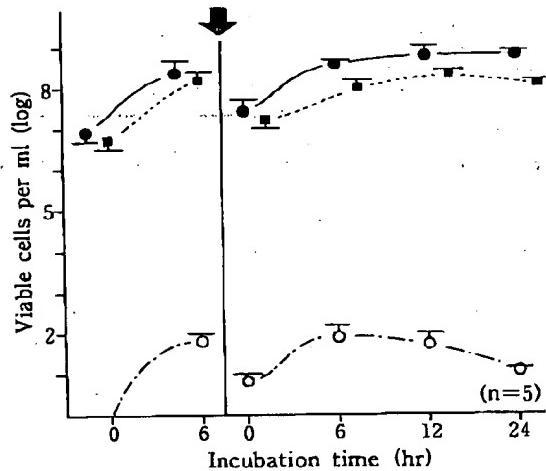


Fig. 6. GM resistant R plasmid transfer between *Serratia* H38RKM and *E. coli* C tol SH38RGM in HI broth (inoculum size: *Serratia* H38RKM  $10^7$  cells/ml, *E. coli*  $10^7$  cells/ml). Symbols: ■; 10-fold dilution with HI broth, ●; *Serratia* H38RKM, ○; GM resistant *Serratia*, ▨; *E. coli* C tol SH38RGM.

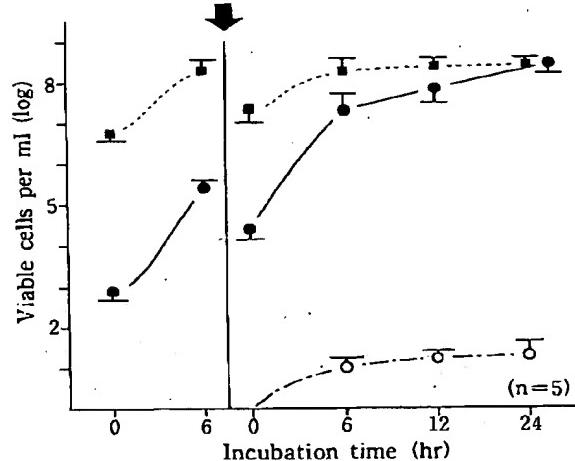


Fig. 7. GM resistant R plasmid transfer between *Serratia* H38RKM and *E. coli* C tol SH38RGM in HI broth (inoculum size: *Serratia* H38RKM  $10^3$  cells/ml, *E. coli*  $10^7$  cells/ml). Symbols: ■; 10-fold dilution with HI broth, ●; *Serratia* H38RKM, ○; GM resistant *Serratia*, ▨; *E. coli* C tol SH38RGM.

認められた。10倍希釈後の経過は、希釈後6時間目で平均  $1.95 \pm 0.26$  log cells/ml, 12時間目で  $1.70 \pm 0.24$  log cells/ml, 24時間目で  $1.06 \pm 0.12$  log cells/ml であり、希釈後24時間目の生菌数は、他の測定時と比較して有意に少ない菌数であった ( $p < 0.05$ )。すなわち GM 耐性 *Serratia* は、希釈後6時間目以降は経時的に減少していった。

(2) *Serratia* H38RKM  $10^7$  cells/ml + *E. coli*  $10^7$  cells/ml の混合接種（以下 SK'E<sup>7</sup> 接種と略称）の場合 (Fig. 7): *Serratia*, *E. coli* のそれぞれの増殖経過は、S<sup>3</sup>E<sup>7</sup> 接種の場合とほぼ同様の増殖経過を示した。

GM 耐性 *Serratia* の経時的な変化は、混合接種後6時間目では生菌数は全例 10 cells/ml 以下で測定できなかった。10倍希釈後の経過は、希釈後6時間目での生菌数は平均  $1.06 \pm 0.12$  log cells/ml, 12時間目で  $1.20 \pm 0.18$  log cells/ml, 24時間目で平均  $1.27 \pm 0.40$  log cells/ml であり、希釈後6時間目以降は 10 cells/ml 前後で一定しており、経時的な増加は認められなかった。

(3) *Serratia* H38RKM  $10^7$  cells/ml + *E. coli*  $10^3$  cells/ml の混合接種（以下 SK'E<sup>7</sup> 接種と略称）の場合 (Fig. 8): *Serratia*, *E. coli* のそれぞれの増殖経過は、S<sup>7</sup>E<sup>3</sup> 接種の場合とほぼ同様の増殖経過を示した。

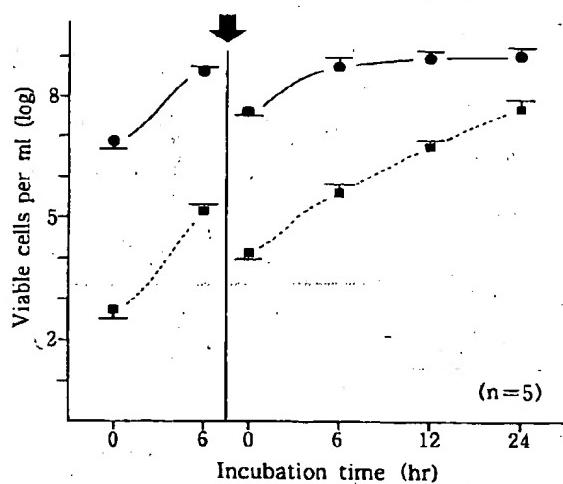


Fig. 8. GM resistant R plasmid transfer between *Serratia* H38RKM and *E. coli* C tol SH38RGM in HI broth (inoculum size: *Serratia* H38RKM  $10^7$  cells/ml, *E. coli*  $10^3$  cells/ml). Symbols: ▲; 10-fold dilution with HI broth, ●; *Serratia* H38RKM, ○; GM resistant *Serratia*, ■; *E. coli* C tol SH38RGM.

Table 5. Viable cells of GM resistant *Serratia* at 6 hr after inoculum and at 24 hr after 10-fold dilution in HI broth associated with each combination of inoculum

Combination of inoculum	Viable cells of GM resistant <i>Serratia</i> (log cells/ml, mean $\pm$ S. D.)	
	At 6 hr after inoculum	At 24 hr after 10-fold dilution
S'E <sup>7</sup>	3.39 $\pm$ 0.28	4.09 $\pm$ 0.15
S <sup>3</sup> E <sup>7</sup>	1.48 $\pm$ 0.61	4.75 $\pm$ 0.12
S'E <sup>3</sup>	1.80 $\pm$ 0.55	1.62 $\pm$ 0.20
SK'E <sup>7</sup>	1.84 $\pm$ 0.09	1.06 $\pm$ 0.12
SK <sup>3</sup> E <sup>7</sup>	not detectable	1.27 $\pm$ 0.40
SK'E <sup>3</sup>	not detectable	not detectable

#### Inoculum size

S<sup>7</sup>: *Serratia* H38  $10^7$  cells/ml, S<sup>3</sup>: *Serratia* H38  $10^3$  cells/ml,

SK<sup>7</sup>: *Serratia* H38RKM  $10^7$  cells/ml,

SK<sup>3</sup>: *Serratia* H38RKM  $10^3$  cells/ml,

E<sup>7</sup>: *E. coli* C tol SH38RGM  $10^7$  cells/ml,

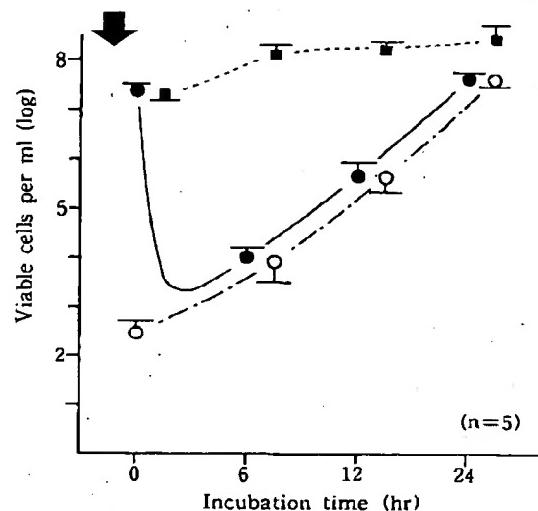
E<sup>3</sup>: *E. coli* C tol SH38RGM  $10^3$  cells/ml.

GM 耐性 *Serratia* は、全例が各測定時とも 10 cells/ml 以下で測定できなかった。

*Serratia* への GM 耐性 R 因子の伝播を検討する目的で、GM 耐性 *Serratia* の生菌数を混合接種の各種組み合わせ別に、混合接種後6時間目, 10倍希釈後24時間目で比較した (Table 5)。

GM 耐性 R 因子の伝達頻度を *Serratia* の菌株別に検討する目的で、混合接種6時間目での GM 耐性 *Serratia* の生菌数を S'E<sup>7</sup> 接種と SK'E<sup>7</sup> 接種とで比較してみた。GM 耐性 *Serratia* の生菌数はそれぞれ  $3.39 \pm 0.28$  log cells/ml,  $1.84 \pm 0.09$  log cells/ml であり、SK'E<sup>7</sup> 接種の場合は生菌数は明らかに低くなっていた。すなわち KM 耐性 R 因子を保有する *Serratia* H38RKM は、GM 耐性 R 因子を獲得する頻度が *Serratia* H38 と比較して約  $10^{-2}$  程度低くなっていた。

*Serratia* への R 因子の伝播を混合接種菌量の組み合わせ別に検討する目的で、10倍希釈後24時間目での GM 耐性 *Serratia* の生菌数を S'E<sup>7</sup> 接種, S<sup>3</sup>E<sup>7</sup> 接種, S'E<sup>3</sup> 接種などで比較してみた。GM 耐性 *Serratia* の生菌数はそれぞれ平均  $4.09 \pm 0.15$  log cells/ml,  $4.75 \pm 0.12$  log cells/ml,  $1.62 \pm 0.20$  log cells/ml であり、S<sup>3</sup>E<sup>7</sup> 接種の場合が他の場合と比較してその生菌数は有意に多かった ( $p < 0.05$ )。すなわち GM 耐性 R 因子の *Serratia* への伝播は、S<sup>3</sup>E<sup>7</sup> 接種の場合が最



**Fig. 9.** GM resistant R plasmid transfer between *Serratia* H38 and *E. coli* C tol SH38RGM in HI broth containing GM (inoculum size: *Serratia* H38  $10^7$  cells/ml, *E. coli*  $10^7$  cells/ml). Symbols: ■; 10-fold dilution with HI broth containing GM (final GM concentration, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), ●; *Serratia* H38, ○; GM resistant *Serratia*, ▨; *E. coli* C tol SH38RGM.

も多く広がることになる。

## 2) GM 薬剤含有 HI broth における混合培養

### a) 受容菌として *Serratia* H38 を使用した混合培養

(1)  $S^3E^7$  接種の場合 (Fig. 9): *Serratia* の消長経過は、GM 含有培養液へ接種時その生菌数は平均  $7.36 \pm 0.15$  log cells/ml であったが、初期は *Serratia* が死滅するために生菌数は減少していった。しかし接種後 6 時間目では生菌数は平均  $3.96 \pm 0.20$  log cells/ml, 12 時間目で  $5.65 \pm 0.30$  log cells/ml, 24 時間目で  $7.62 \pm 0.12$  log cells/ml と、*Serratia* は 6 時間目以降は経的に増殖していった。GM 耐性 *Serratia* は、GM 含有培養液へ接種時その生菌数は平均  $2.39 \pm 0.28$  log cells/ml であったが、6 時間目で  $3.85 \pm 0.34$  log cells/ml, 12 時間目で  $5.65 \pm 0.30$  log cells/ml, 24 時間目で  $7.59 \pm 0.12$  log cells/ml であり、6 時間目以降は *Serratia* と GM 耐性 *Serratia* とで生菌数に差が認められなかった。すなわち GM 含有培養液中では、GM 感受性菌の *Serratia* が死滅し

て GM 耐性 *Serratia* が選択的に生き残り、ゆるやかな増殖曲線を示して増殖していった。

*E. coli* の増殖経過は、GM 含有培養液へ接種時その生菌数は平均  $7.31 \pm 0.15$  log cells/ml であったが、6 時間目で  $8.10 \pm 0.19$  log cells/ml とほぼ定常期に達していた。

(2)  $S^3E^7$  接種の場合 (Fig. 10): *Serratia* の消長経過は、*Serratia* が生き残り増殖する場合（以下増殖例と略称）と死滅する場合（以下死滅例と略称）とがあった。11混合培養実験中増殖例は 8 例、死滅例が 3 例であり、全体としては増殖例になる場合が多かった。

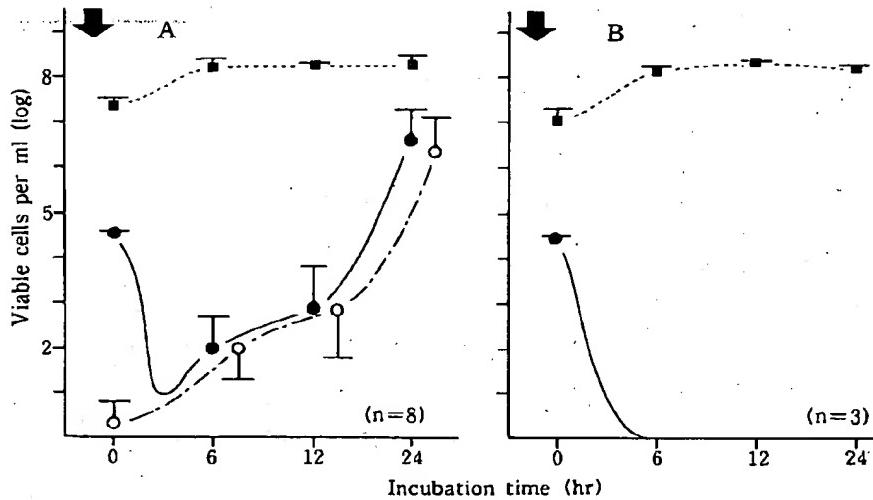
増殖例の場合に GM 含有培養へ接種時 *Serratia* の生菌数は平均  $4.51 \pm 0.13$  log cells/ml であったが、初期は *Serratia* が減少していった。しかし 6 時間目でその生菌数は平均  $1.99 \pm 0.72$  log cells/ml, 12 時間目で  $2.87 \pm 0.94$  log cells/ml, 24 時間目で  $6.59 \pm 0.77$  log cells/ml と、6 時間目以降はゆるやかな増殖曲線を示して経的に増殖していった。GM 耐性 *Serratia* は GM 含有培養液へ接種時その生菌数は平均  $0.30 \pm 0.53$  log cells/ml であったが、6 時間目で  $1.98 \pm 0.73$  log cells/ml, 12 時間目で  $2.80 \pm 1.0$  log cells/ml, 24 時間目で  $6.35 \pm 0.76$  log cells/ml であり、6 時間目以降は *Serratia* と GM 耐性 *Serratia* とで生菌数に差が認められなかった。

死滅例の場合に GM 含有培養液へ接種時 *Serratia* の生菌数は平均  $4.46 \pm 0.13$  log cells/ml であったが、*Serratia* は死滅していく 6 時間目でその生菌数は認められなかった。GM 耐性 *Serratia* は、GM 含有培養液へ接種時その生菌数は認められなかった。

*E. coli* の増殖経過は増殖例と死滅例とで特に差がなく、GM 含有培養液へ接種時その生菌数はそれぞれ平均  $7.32 \pm 0.20$  log cells/ml,  $7.0 \pm 0.28$  log cells/ml であったが、6 時間目でそれぞれ  $8.16 \pm 0.20$  log cells/ml,  $8.12 \pm 0.11$  log cells/ml とほぼ定常期の菌数に達していた。

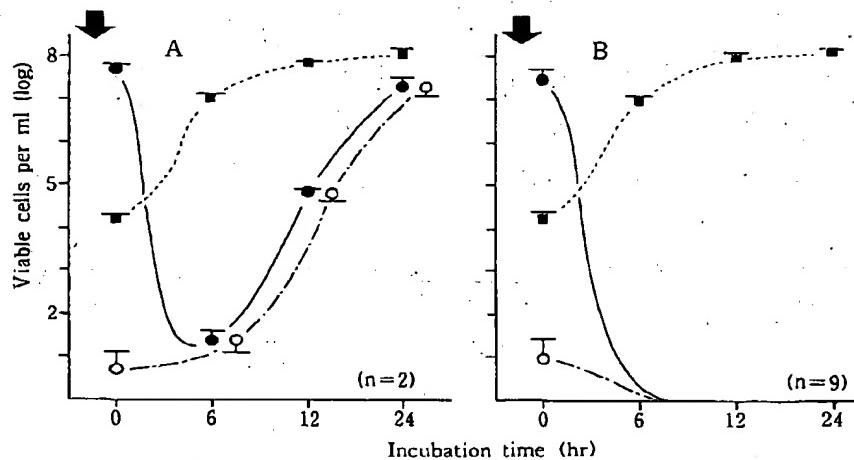
(3)  $S^3E^3$  接種の場合 (Fig. 11): *Serratia* の消長経過は、増殖例と死滅例とがあった。しかし  $S^3E^3$  接種の場合と異なり、11混合培養実験中増殖例が 2 例、死滅例が 9 例で、全体としては死滅例となる場合が多かった。

増殖例の場合に GM 含有培養液へ接種時 *Serratia* の生菌数は平均  $7.74 \pm 0.11$  log cells/ml であったが、初期は *Serratia* が減少していった。しかし 6 時間目でその生菌数は平均  $2.33 \pm 0.29$  log cells/ml, 12 時間目で  $4.76 \pm 0.04$  log cells/ml, 24 時間目で  $7.31 \pm 0.19$  log cells/ml と、6 時間目以降は経的に増殖してい



**Fig. 10. GM resistant R plasmid transfer between *Serratia* H38 and *E. coli* C tol SH38RGM in HI broth containing GM (inoculum size: *Serratia* H38  $10^3$  cells/ml, *E. coli*  $10^7$  cells/ml) A: growth pattern, B: death pattern.**

Symbols: ↓; 10-fold dilution with HI broth containing GM (final GM concentration, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), ●; *Serratia* H38, ○; GM resistant *Serratia*, ■; *E. coli* C tol SH38RGM.



**Fig. 11. GM resistant R plasmid transfer between *Serratia* H38 and *E. coli* C tol SH38RGM in HI-broth containing GM (inoculum size: *Serratia* H38  $10^7$  cells/ml, *E. coli*  $10^3$  cells/ml) A: growth pattern, B: death pattern.**

Symbols: ↓; 10-fold dilution with HI broth containing GM (final GM concentration, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), ●; *Serratia* H38, ○; GM resistant *Serratia*, ■; *E. coli* C tol SH38RGM.

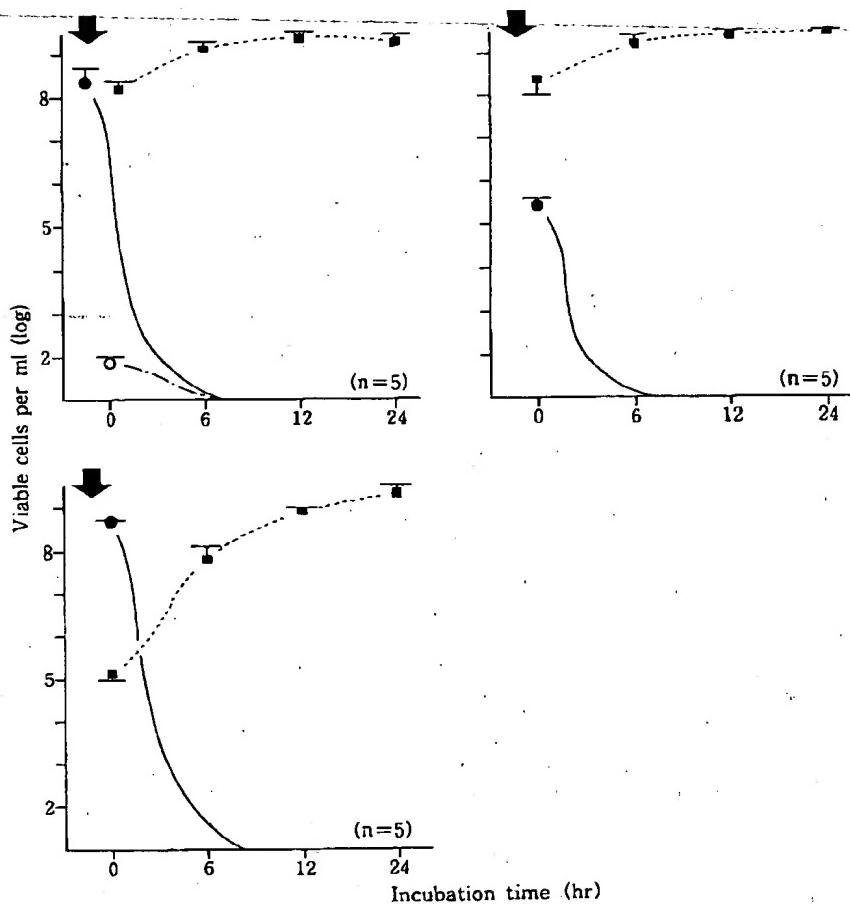


Fig. 12. GM resistant R plasmid transfer between *Serratia* H38RKM and *E. coli* C tol SH38RGM in HI broth containing GM associated with each inoculum size.

Inoculum size: A ; *Serratia* H38RKM  $10^7$  cells/ml, *E. coli*  $10^7$  cells/ml.

B ; *Serratia* H38RKM  $10^3$  cells/ml, *E. coli*  $10^7$  cells/ml.

C ; *Serratia* H38RKM  $10^7$  cells/ml, *E. coli*  $10^3$  cells/ml.

Symbols: ↓ ; 10-fold dilution with HI broth containing GM (final GM concentration, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), ● ; *Serratia* H38RKM, ○ ; GM resistant *Serratia*, ■ ; *E. coli* C tol SH38RGM.

た。GM 耐性 *Serratia* は GM 含有培養液へ接種時その生菌数は平均  $0.64 \pm 0.64$  log cells/ml であったが、6 時間目で  $2.37 \pm 0.26$  log cells/ml, 12 時間目で  $4.77 \pm 0.15$  log cells/ml, 24 時間目で  $7.29 \pm 0.15$  log cells/ml であり、6 時間目以降は *Serratia* と GM 耐性 *Serratia* とで生菌数に差が認められなかった。

死滅例の場合に GM 含有培養液へ接種時 *Serratia* の生菌数は平均  $7.51 \pm 0.21$  log cells/ml であったが、*Serratia* は死滅していく 6 時間目で生菌数は認められなかつた。GM 耐性 *Serratia* は、GM 含有培養液へ接種時その生菌数は平均  $0.98 \pm 0.39$  log cells/ml 認められた。

*E. coli* の増殖経過は増殖例と死滅例とで特に差が

なく、GM 含有培養液へ接種時その生菌数はそれぞれ  $4.19 \pm 0.13$  log cells/ml,  $4.26 \pm 0.15$  log cells/ml であったが、6 時間目でそれぞれ  $6.98 \pm 0.12$  log cells/ml,  $6.95 \pm 0.17$  log cells/ml, 12 時間目でそれぞれ  $7.80 \pm 0.10$  log cells/ml,  $7.92 \pm 0.22$  log cells/ml, 24 時間目でそれぞれ  $8.11 \pm 0.07$  log cells/ml,  $8.03 \pm 0.17$  log cells/ml であり、両者ともに 12 時間目で定常期近くの菌数に達していた。すなわち *E. coli* の増殖経過は、通常の培養液中 (Fig. 5) と比較して GM 含有培養液中では *Serratia* の生菌数が減少するため、その増殖は促進された。

b) 受容菌として *Serratia* H38RKM を使用した混合培養 (Fig. 12)

*Serratia* の消長経過は SK<sup>7</sup>E<sup>7</sup> 接種, SK<sup>3</sup>E<sup>7</sup> 接種, SK<sup>7</sup>E<sup>3</sup> 接種の各場合とも全例が死滅例であり, 培養 6 時間目でその生菌数は認められなかった。GM 含有培養液と接種時の GM 耐性 *Serratia* の生菌数は, SK<sup>7</sup>E<sup>7</sup> 接種の場合平均  $0.84 \pm 0.09$  log cells/ml 認められたが, SK<sup>3</sup>E<sup>7</sup> 接種と SK<sup>7</sup>E<sup>3</sup> 接種の場合は生菌数は認められなかった。

*E. coli* の増殖経過は SK<sup>7</sup>E<sup>7</sup> 接種, SK<sup>3</sup>E<sup>7</sup> 接種, SK<sup>7</sup>E<sup>3</sup> 接種などにおいて, それぞれ S<sup>7</sup>E<sup>7</sup> 接種, S<sup>3</sup>E<sup>7</sup> 接種, S<sup>7</sup>E<sup>3</sup> 接種の場合とはほぼ同じ増殖経過を示した。

GM 含有培養液中での *Serratia* の消長を混合接種の組み合わせでみると, S<sup>7</sup>E<sup>7</sup> 接種の場合は全例増殖例であった。これに対して S<sup>3</sup>E<sup>7</sup> 接種の場合は 11 混合培養実験中 8 例が増殖例であり, S<sup>7</sup>E<sup>3</sup> 接種の場合は 11 混合培養実験中 9 例が死滅例で, これらを比較すると両群間に有意差が認められた ( $p < 0.05$ )。すなわち S<sup>3</sup>E<sup>7</sup> 接種の場合は増殖例となる場合が多く, S<sup>7</sup>E<sup>3</sup> 接種では死滅例となる場合が多かった。受容菌として *Serratia* H38RKM を使用した場合に, 各混合接種の組み合わせの場合とも全例が死滅例であった。

以上の *Serratia* の消長に影響を与える因子を検討する目的で, GM 含有培養液へ接種時の GM 耐性 *Serratia*, *Serratia*, *E. coli* の各菌種の生菌数を, 混合接種の組み合わせ別に, また *Serratia* の消長別に検討を加えた (Table 6)。

GM 耐性 *Serratia* の生菌数でみると, 増殖例である S<sup>7</sup>E<sup>7</sup> 接種の場合は生菌数は平均  $2.39 \pm 0.28$  log cells/ml と十分な菌数が認められた。S<sup>7</sup>E<sup>7</sup> 接種の死

滅例, SK<sup>7</sup>E<sup>7</sup> 接種, SK<sup>3</sup>E<sup>7</sup> 接種の各場合とも GM 耐性 *Serratia* は認められなかつたが, いずれの場合も死滅例であった。増殖例が多い S<sup>3</sup>E<sup>7</sup> 接種, 死滅例が多くなる S<sup>7</sup>E<sup>3</sup> 接種, 全例死滅例の SK<sup>7</sup>E<sup>7</sup> 接種の各場合は, いずれも GM 耐性 *Serratia* の生菌数は 10 cells/ml 以下であり, その生菌数の比較で差は認められなかつた。

増殖例が多い S<sup>3</sup>E<sup>7</sup> 接種, 死滅例が多い S<sup>7</sup>E<sup>3</sup> 接種, 全例が死滅例の SK<sup>7</sup>E<sup>7</sup> 接種の各場合を *Serratia* の生菌数で比較してみると, S<sup>3</sup>E<sup>7</sup> 接種の場合は  $10^4$  cells/ml 台であるのに対して, S<sup>7</sup>E<sup>3</sup> 接種, SK<sup>7</sup>E<sup>7</sup> 接種の場合はそれぞれ  $10^7$  cells/ml とその菌数は明らかに多かつた。

## 考 案

### 1. 菌種間の相互作用について

*Serratia*, *E. coli* の単独培養と混合培養を行い, 菌種間の相互作用が細菌の増殖にどのような影響を与えるかを検討した。

*Serratia* と *E. coli* のそれぞれの増殖速度を単独培養と混合培養とで比較してみると, 単独培養と比べて, 他菌種が定常期にある混合培養中では, その増殖速度は明らかに遅延していた (Fig. 1, 2)。このことはある菌種が定常期まで増殖するに伴って栄養基質の消費と有害物質の蓄積を生じ, その生活環境を悪化させることになる。この生活環境の悪化が他菌種の増殖を抑制するためとも考えられる。これに関して *E. coli* と *P. aeruginosa* の混合培養では *E. coli* の影響をうけて *P.*

Table 6. Viable cells of each strain inoculated in HI broth containing GM associated with each combination of inoculum

Combination of inoculum	Growth pattern of <i>Serratia</i> in HI broth containing GM	No. of experiment	Viable cells of each strain (log cells/ml, mean $\pm$ S. D.)		
			GM resistant <i>Serratia</i>	<i>Serratia</i>	<i>E. coli</i>
S <sup>7</sup> E <sup>7</sup>	growth	5	$2.39 \pm 0.28$	$7.36 \pm 0.15$	$7.31 \pm 0.15$
S <sup>3</sup> E <sup>7</sup>	growth	8	$0.30 \pm 0.53$	$4.51 \pm 0.13$	$7.32 \pm 0.20$
	death	3	not detectable	$4.46 \pm 0.13$	$7.00 \pm 0.28$
S <sup>7</sup> E <sup>3</sup>	growth	2	$0.64 \pm 0.64$	$7.74 \pm 0.11$	$4.19 \pm 0.13$
	death	9	$0.98 \pm 0.39$	$7.51 \pm 0.21$	$4.26 \pm 0.15$
SK <sup>7</sup> E <sup>7</sup>	death	5	$0.84 \pm 0.09$	$7.37 \pm 0.32$	$7.21 \pm 0.21$
SK <sup>3</sup> E <sup>7</sup>	death	5	not detectable	$4.35 \pm 0.21$	$7.29 \pm 0.34$
	death	5	not detectable	$7.63 \pm 0.10$	$4.11 \pm 0.15$

### Inoculum size

S<sup>7</sup>: *Serratia* H38  $10^7$  cells/ml, S<sup>3</sup>: *Serratia* H38  $10^3$  cells/ml,

SK<sup>7</sup>: *Serratia* H38RKM  $10^7$  cells/ml, SK<sup>3</sup>: *Serratia* H38RKM  $10^3$  cells/ml,

E<sup>7</sup>: *E. coli* C tol SH38RGM  $10^7$  cells/ml, E<sup>3</sup>: *E. coli* C tol SH38RGM  $10^3$  cells/ml.

*aeruginosa* の増殖が抑制されるが, *E. coli* の培養液を用いて *P. aeruginosa* を培養した場合は増殖阻止効果は認められなかったという報告<sup>58)</sup>がある。このことは細菌の増殖を抑制するものとして栄養基質の消費と有害物質の蓄積以外の要因が考えられ、この要因として培養液中の細菌の細胞濃度があげられる。

通常バッチ培養下では細菌の増殖は細胞分裂をくり返して増殖していくわけであるが、定常期に達するとその増殖が停止する。この定常期における増殖の停止は、培養液中の栄養基質の消費と有害物質の蓄積のみでは説明出来ない。この点については、対数期の *E. coli* を集めて種々の細胞濃度で新しい合成培地に接種した場合に、 $10^{9.7}$  cells/ml 以上の *E. coli* を接種すると増殖が全く起らぬといいう実験成績から、細菌は液体培地内では一定の細胞濃度以上には増殖できないと解釈し、この細胞濃度をM濃度といい、この現象を混雑効果と命名した<sup>62)</sup>。このことはもちろん単独培養での現象である。しかしこの細胞濃度の見地からすれば、混合培養の場合でも、ある菌種の定常期の細胞濃度が他菌種の増殖に影響を及ぼし、その増殖を抑制するものと考えられる。このように異種菌種の混合培養では、菌種間の相互作用により菌の増殖は抑制されたものとなる。しかしある菌種が定常期でその増殖が停止した状態であっても、他菌種は抑制されながらでも増殖を定常期まで続けるわけであり、異種菌種はそれぞれ別の細胞集団として異なる増殖経過をたどるものと考えられる。

しかし同一菌株から派生した菌種間、たとえばある受容菌と、その受容菌がR因子を受け取りR因子保有菌に変換された菌（以下R変換菌と名称）との菌種間では、上記のごとき別々の細胞集団として異なる増殖経過をたどることはないと考えられる。これについては受容菌の *E. coli* が  $10^9$  cells/ml と定常期にある状態の培養液中に、そのR変換菌の *E. coli* を  $10^3$  cells/ml 以下で接種した場合、経時的にみてR変換菌の生菌数は一定のままであったといいう実験成績<sup>10)</sup>がある。このことはR変換菌の *E. coli* が  $10^3$  cells/ml 以下の場合は、接合伝達が起こらなかったことを意味するものである。しかし別の見方をすれば、受容菌が定常期にあって増殖が停止している時は、たとえR変換菌の菌数が少ない状態であっても、その増殖も停止したこと意味している。すなわちこれらの菌種間では、一つの細胞集団として同調した増殖経過をたどるものと考えられる。これらの菌種間でR因子の伝達が起こらない状態と仮定した場合に、R変換菌の増殖経過は受容菌の増殖経過と一致するわけである

から、受容菌の菌数が多くなるほどR変換菌の増殖もゆるやかなものになる。すなわち受容菌の菌数が多くなるほどR変換菌の増殖を強く抑制し、受容菌の定常期細胞濃度はR変換菌の増殖を停止させるものと考えられ、これらの菌種間での増殖抑制効果は異種菌種間の場合と比較して強くなるものと思われる。

また細菌の増殖に影響を与える菌種間の相互作用は、それらの菌が持つ性質も考慮する必要がある。*E. coli* をはじめとする腸内細菌、*P. aeruginosa* などは、bacteriocin 産生菌が多く認められる<sup>17, 18, 36, 55)</sup>。bacteriocin は他の近縁の細胞を殺滅する蛋白性の抗菌物質であり、これに対する感受性菌は bacteriocin の影響を受けて増殖が阻害されることになる。*E. coli* と *P. aeruginosa* との混合培養において、*E. coli* の増殖は *P. aeruginosa* の影響を受けにくく、*P. aeruginosa* は *E. coli* の影響を受けて増殖が抑制されるという報告<sup>58)</sup>のごとく、菌種間の相互作用は菌種によって増殖抑制効果は異なるものと考えられる。

以上の実験結果を生態学的見知から考えれば、細菌が生息する生態系では、ある菌種の増殖に伴って環境諸要因が容易に影響を受けて変化する。そしてこの変化した要因が他菌種の生息に影響を与えることになる。このような因果関係は尿路でも同様で、尿路内にある菌種が定着した場合に、その菌種の増殖により尿路内での生活環境に変化が生じる。すなわちある菌の存在が他菌種の侵入、定着に不都合な生活環境に変化させることが起り得ると考えられる。

## 2. 臨床分離株の *Serratia* へのR因子の伝播について

R因子を持つ供与菌とそれを受ける受容菌との間におけるR因子の接合伝達の過程は、一般的に以下の4つの過程から成り立っている<sup>11, 21, 29)</sup>。(1)供与菌と受容菌が接触して供与菌の性線毛が受容菌の表面に付着する（特異的接合対の形成）。(2)両菌間に比較的安定な接合対が生成する（効果的接合対の形成）。(3)供与菌内のR因子 DNA の一方の鎖が受容菌に向かって移行を開始する（R因子 DNA の移動）。(4)受容菌に送り込まれた1本鎖 DNA に相補的な DNA が合成され、さらに環状2重鎖 DNA となり、R因子は複製される（DNA の安定化、伝達の完了）。

R因子の接合伝達の効率は、供与菌と受容菌の両方の側の要因によって影響を受ける。供与菌側の要因としては、供与菌の性線毛の生成頻度である。R因子を持つ供与菌の性線毛が受容菌の表面に付着して特異的接合対の形成をする訳であるから、性線毛の生成頻度

が高いほどR因子の伝達頻度は高くなる。しかし多くのR因子は性線毛形成を抑制された状態にあり<sup>31,32</sup>、その性線毛形成頻度は $10^{-4}$ 前後とされている<sup>21</sup>。また性線毛形成はその宿主の細菌の生理的条件が影響を与え、定常期の後期にはR因子の伝達頻度は低下し、栄養的に飢餓状態におくと性線毛は菌表面から消失するという<sup>12,56</sup>。

受容菌側が持つ要因としては、表面排斥、不和合性、制限現象などがあげられている。一般に受容菌が供与菌と類似のプラスミドを持つとき、表面排斥と不和合性のためR因子の伝達効率は著しく低下する<sup>8,29,37,49,61</sup>。表面排斥とは、受容菌内のプラスミドが接合対の生成とDNAの移入を妨げる現象である。また不和合性とは受容菌内にR因子など新たにプラスミドが移入した後に生じる現象で、受容菌にある在来のプラスミドと不和合性を示し、結局どちらか一方のプラスミドが排斥される現象である。

制限現象とは細菌がプラスミドなどの異質のDNAの移入を受けたとき、これを制限酵素で分解する現象で、修飾は制限を受けない状態にDNAを一代限り変化させるものである<sup>4,29</sup>。各菌種はそれぞれ外来性のDNAを識別して分解する制限酵素を持っている<sup>4,52</sup>。また多くのR因子は宿主と独立した制限、修飾系の遺伝子を持っており<sup>5,63</sup>、その場合に効果は相加的になる。

このように臨床分離株の*Serratia*へのR因子の伝播は、その菌が持つR因子の伝達を阻害する因子のため、通常の伝達実験で受容菌として使用される実験株よりは伝達頻度は低いものと考えられる。これらのこととを確認する目的で、供与菌としてGM耐性R因子を保有する*E. coli* C tol SH38RGMを使用し、受容菌として臨床分離株の*Serratia* H38とそれにKM耐性R因子を保有した*Serratia* H38RKMを使用して混合培養を行い、それら受容菌へのGM耐性R因子の伝達経過を検討した。

接種菌量が供与菌、受容菌とも十分にある状態、すなわちS'E'接種とSK'E'接種で検討した。受容菌が*Serratia* H38のS'E'接種の場合に(Fig. 3)、GM耐性*Serratia*の生菌数は混合接種後6時間目で平均 $3.39 \pm 0.28$ log cells/mlであり、その後の経時的な増加は軽度あるのみで、10倍希釈後24時間目でその生菌数は平均 $4.09 \pm 0.15$ log cells/mlと受容菌の約0.01%しかR変換菌のGM耐性*Serratia*に変換されなかつた。受容菌が*Serratia* H38RKMのSK'E'接種の場合(Fig. 6)、受容菌がKM耐性R因子を保有しており、*Serratia* H38と比較してその伝達頻度は $10^{-2}$ 程

度低くなってしまい、混合接種後6時間目のGM耐性*Serratia*の生菌数は平均 $1.84 \pm 0.09$ log cells/mlであった。経時にみても不和合性の伝達阻害のためか、その生菌数は減少して10倍希釈後24時間目では $1.06 \pm 0.12$ log cells/mlであった。一般的には適当な受容菌を使用すれば、R因子を受け取った受容菌が新たな供与菌となり次々と伝達が広がり、一夜培養すれば受容菌の1%以上がR変換菌になると言われている<sup>16</sup>。しかしこのように臨床分離株の*Serratia*へのR因子の伝達頻度は、その菌の持つ伝達阻害の因子のため低くなり、二次伝達などあまり多く生じないため、経時にみてもR変換菌が著明に増加する例は少ないと思われる。またすでにR因子を保有する*Serratia*への新たな他のR因子の伝達は、その伝達阻害が強ければほとんど生じないか、生じても不和合性によりR変換菌が経時に減少する場合もあると考えられる。すなわち臨床分離株の*Serratia*へのR因子の伝播は、何か強い選択力がなければ、さほど広まらないことが推定される。

次に供与菌と受容菌の接種菌量の相違が、受容菌のR変換菌への変換率に影響を与えると考えられる。そこでこの接種菌量の違いによって生ずる変換率の差を、S'E'接種とS'E<sup>3</sup>接種とで比較検討してみた。S'E'接種の場合に(Fig. 4)、R変換菌であるGM耐性*Serratia*は*Serratia*の増殖経過とほぼ同調して経時に増加し、希釈後24時間目でその生菌数は平均 $4.75 \pm 0.12$ log cells/mlであった。このことは受容菌の*Serratia*の増殖に伴い、接合伝達によりR因子を獲得したR変換菌の*Serratia*が増加することを示すものである。さらにR変換菌は、*Serratia*の増殖経過と同調し細胞分裂を続けて増殖するためと考えられる。S'E<sup>3</sup>の場合は(Fig. 5)、混合培養の経過中を通して受容菌の*Serratia*がほぼ定常期にあるため、R変換菌の*Serratia*の増加はほぼ接合伝達のみによるものと考えられる。すなわち希釈後12時間目までは供与菌の*E. coli*の増殖経過に伴い、R変換菌であるGM耐性*Serratia*は増加する。しかしそれ以後は培養液中の栄養基質の消費などにより*E. coli*の性線毛形成が低下するためか、*E. coli*が増殖しているにもかかわらずGM耐性*Serratia*は一定であり、希釈後24時間目でその生菌数は平均 $1.62 \pm 0.20$ log cells/mlであった。これをS'E'接種と比較してみると、*Serratia*のR変換菌への変換率は明らかに低い値であった。

このことにより尿路内、あるいは蓄尿バッグ内でのR因子の伝播を考えてみると、尿路に受容菌が定着していてR因子を持つ供与菌が侵入する場合に比較し

て、尿路に R 因子を持つ供与菌が定着していて受容菌が侵入する場合の方が受容菌の R 変換菌への変換率ははるかに高くなると考えられる。すなわち尿路に R 因子保有菌が定着していれば、他菌種への R 因子の伝播が生じる可能性は高いと考えられる。しかし R 因子保有菌が定着している尿は当然ながら抗生素含有尿である可能性が高く、したがって R 因子を受けとる受容菌は、このような環境下でも侵入できる薬剤耐性菌であることが必要条件と考えられる。

### 3. 抗生剤の影響について

細菌と抗生剤との関係を生態学的に考えれば、抗生剤の使用は抗菌力により薬剤感受性菌を死滅させ、その環境諸要因が影響を受けて容易に変化し、変化した要因が他菌種の生息に影響を与えることが推定される。そこでこのような抗生剤の影響を追究する目的で、混合培養液中に GM を添加して各菌種の消長、経過を検討した。

GM 耐性菌である *E. coli* の増殖は、GM 含有培養液中では、GM を添加しない場合と比較して増殖は良好となり、促進された (Fig. 11, 12)。この理由としては、GM 感受性菌の *Serratia* が死滅していく、それについて *Serratia* が持つ *E. coli* の増殖抑制因子が消失するためと考えられた。

*Serratia* の消長に関しては 2 種類の経過があつて、*Serratia* が生き残り増殖する場合と、*Serratia* が死滅して消失する場合である。この消長経過を決定する主たる要因は、GM 含有培養液へ接種する時の GM 耐性 *Serratia* の生菌数である。GM 耐性 *Serratia* の生菌数がある程度あれば、当然 GM 耐性 *Serratia* が生き残り選択的に増殖していく (Fig. 9)。また GM 耐性 *Serratia* が接種時に認められなければ、当然 *Serratia* は死滅していく消失する (Fig. 12)。

しかし GM 含有培養液へ接種する GM 耐性 *Serratia* の生菌数が非常に少ない場合は、生菌数以外の要因も菌の消長経過に関与すると考えられる。S<sup>3</sup>E<sup>7</sup> 接種、S<sup>7</sup>E<sup>3</sup> 接種、SK<sup>7</sup>E<sup>7</sup> 接種の各培養実験においては、GM 含有培養液へ接種する GM 耐性 *Serratia* の生菌数は 3 接種間で特に差がなく、いずれも 10 cells/ml 以下であった。ところが S<sup>3</sup>E<sup>7</sup> 接種では *Serratia* が生き残り増殖する例が多く、S<sup>7</sup>E<sup>3</sup> 接種では *Serratia* が消失する例が多く、SK<sup>7</sup>E<sup>7</sup> 接種では全例消失というごとく異なった経過を示した (Fig. 10, 11, 12)。

この消長経過の相違は、*Serratia* による GM 耐性 *Serratia* の増殖抑制程度の相違によるものと考えられる。GM 含有培養液に接種する *Serratia* の生菌数は、

S<sup>3</sup>E<sup>7</sup> 接種の場合は 10<sup>4</sup> cells/ml 台と対数増殖期の菌数であるのに対して、S<sup>7</sup>E<sup>3</sup> 接種と SK<sup>7</sup>E<sup>7</sup> 接種の場合には生菌数はいずれも 10<sup>7</sup> cells/ml 台と対数増殖期後期の菌数であった。GM の抗菌力により GM 感受性菌の *Serratia* が接種後直ちにすべて死滅するのであれば、このような考慮は必要ないはずである。ところが実際は感受性菌の死滅は瞬時に起こるのではなく、経時的に生菌数が減少していくわけであるから、*Serratia* の菌数が多ければ多いほど GM 含有培養液中に *Serratia* が長くとどまるものと考えられる。S<sup>7</sup>E<sup>3</sup> 接種と SK<sup>7</sup>E<sup>7</sup> 接種の場合は、GM 含有培養液へ接種直後は *Serratia* の菌数がまだ多いので、*Serratia* による GM 耐性 *Serratia* への増殖抑制効果が強く残っていることが予想される。そして GM 含有培養液へ接種する GM 耐性 *Serratia* の生菌数は非常に少ないわけであるから、たとえ GM 耐性菌であつてもある程度は GM の抗菌力の影響を受けることになる。これに共存する *Serratia* の増殖抑制効果が加わるため、GM 耐性菌の消失する例が多くなるものと考えられる。

S<sup>3</sup>E<sup>7</sup> 接種の場合は、GM 含有培養液へ接種する *Serratia* の生菌数は 10<sup>4</sup> cells/ml と少なく、またその培養液中でも *Serratia* は早く死滅するものと思われる。すなわち S<sup>7</sup>E<sup>3</sup> 接種と SK<sup>7</sup>E<sup>7</sup> 接種の場合のような GM 耐性 *Serratia* に対する *Serratia* の増殖抑制効果は S<sup>3</sup>E<sup>7</sup> 接種では少くなり、そのため GM 耐性 *Serratia* が生き残り増殖する例が多いものと考えられる。

*Serratia* による尿路感染症は病院内感染として起る場合が多く、尿路にカテーテル留置中、またはカテーテル留置経験がある症例に高頻度に発症することはよく知られている<sup>1, 7, 23, 27, 28, 44, 45</sup>。また *Serratia* 分離時には、抗菌剤の投与が行われていることが多い<sup>7, 28, 34, 43-45, 50</sup>。そして使用される抗生剤は通常の感染症の治療に好んで用いられる  $\beta$ -lactum 系抗生剤が大部分で<sup>34, 44, 50</sup>、 $\beta$ -lactum 系抗生剤に対して *Serratia* は耐性菌である<sup>9, 22, 35</sup>。したがって  $\beta$ -lactum 系抗生剤の使用により耐性菌である *Serratia* が尿路、あるいは膀胱内などで選択的に生き残り、増殖して尿路内へ侵入し *Serratia* による尿路感染症を成立させるのである。

また体内の異なる感染部位により、*Serratia* の薬剤感受性に相違があるとの報告がある。すなわち尿路由来株は他部位由来株に比較して耐性株が高頻度であり、GM 耐性株の耐性化率も尿路由来株に多く、その耐性獲得には R 因子の関与が指摘されている<sup>6</sup>。また尿

路由来株からのR因子の検出率は、他部位由来株に比較するとかなり高いといわれる<sup>2,24)</sup>。これらのこととはいずれも尿路内、あるいは着尿バッグ内における*Serratia*へのR因子の伝播を示唆するものと考えられる。

結局のところ *Serratia* は、(1)自然耐性として多くの抗生素に対する感受性が低い、(2)臨床的に使用頻度が高い  $\beta$ -lactum 系抗生素は *Serratia* に対する抗菌力がないなどの理由で病院内に選択的に生き残り、R因子伝播における適当な受容菌となる可能性が高い。また尿は適当な細菌培養液であるから<sup>16)</sup>、R因子保有菌が尿中に存在すれば *Serratia* へのR因子伝播が生じやすい。R因子を獲得して多剤耐性菌となった *Serratia* は、元来は *Serratia* に抗菌力を有する抗生素に対しても耐性となって生き残り、病院内環境に生息して院内感染症の主要な原因菌となるものと考えられる。

### 謝 詞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲をたまわりました恩師仁平寛巳教授に深謝いたします。

本研究に種々の御協力をいただいた当教室の先生方ならびに和田敬子女史に深謝いたします。

なお本論文の一部は第31回日本化學療法学会総会（大阪市、1983）で発表した。

### 参考文献

- Allen, S. D. and Conger, K. B. 1968. *Serratia marcescens* infection of the urinary tract: a nosocomial infection. *J. Urol.* 101:621-623.
- Alvarz, J. S. and Regueiro, B. 1980. R plasmids from clinical isolates of *Serratia marcescens*. *J. Hospital Infection* 1:133-139.
- Aserkoff, B. and Bennett, J. V. 1969. Effect of antibiotic therapy in acute salmonellosis on the fecal excretion of *Salmonellae*. *New. Engl. J. Med.* 281:636-640.
- Boyer, H. W. 1971. DNA restriction and modification mechanisms in bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 25:153-176.
- Boyer, H. W., Chow, L. T., Dugaiczyk, A., Hedgpeth, J. and Goodman, H. M. 1973. DNA substrate site for the Eco R11 restriction endonuclease and modification methylase. *Nature New. Biol.* 244:40-43.
- Brown, A., Davis, L., Yee, R. B. and Postic, B. 1978. Endemic *Serratia marcescens* in the Veterans Administration Hospital in Pittsburgh, Pa., 1971-1976. *Health Lab. Sci.* 15:159-167.
- Clayton, E. and von Graevenitz, A. 1966. Nonpigmented *Serratia marcescens*. *J. A. M. A.* 197:1059-1064.
- Clowes, R. C. 1972. Molecular structure of bacterial plasmids. *Bacteriol. Rev.* 36:361-405.
- Cooksey, R. C., Bannister, E. R. and Farrar, W. E. 1975. Antibiotic resistance patterns of clinical isolates of *Serratia marcescens*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 7:396-399.
- Cooksey, R. C., Thorne, G. M. and Farrar, W. E. 1976. R factor-mediated antibiotic resistance in *Serratia marcescens*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 10:123-127.
- Curtiss III, R. 1969. Bacterial conjugation. *Ann. Rev. Microbiol.* 23:69-136.
- Curtiss III, R., Caro, L. G., Allison, D. P. and Stallions, D. R. 1969. Early stages of conjugation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 100:1091-1104.
- Dodson, W. H. 1968. *Serratia marcescens* septicemia. *Arch. Intern. Med.* 121:145-150.
- Duval-Iflah, Y., Raibaud, P., Tancrede, C. and Rousseau, M. 1980. R-plasmid transfer from *Serratia liquefaciens* to *Escherichia coli* in vitro and in vivo in the digestive tract of gnotobiotic mice associated with human fecal flora. *Infect. Immun.* 28:981-990.
- Egawa, R., Hara, Y., Mitsuhashi, S. and Cohen, S. H. 1969. Demonstration of R factors in enteric bacteria isolated at the Boston City Hospital. *Japan J. Microbiol.* 13:241-245.
- Falkow, S.: 河野 恵, 新井俊彦(訳) 1977. R因子の遺伝的性質, p. 88-113. 多剤耐性. 講談社, 東京.
- Farmar III, J. J. and Herman, L. G. 1969. Epidemiological fingerprinting of *Pseudomonas aeruginosa* by the production of and sensitivity to pyocin and bacteriophage. *Appl. Microbiol.* 18:760-765.
- Fredericq, P. 1957. Colicins. *Ann. Rev. Microbiol.* 11:7-22.
- Harada, K. and Mitsuhashi, S. 1971. Physiology of R factors, p. 99-134, In Mitsuhashi, S. (ed.), Transferable drug resistance Factor R. University of Tokyo press, Tokyo.
- 猪守 淳, 小酒井望, 小栗豊子, 村瀬光春 1977. *Serratia* による尿路感染 第1報 尿路分離株を中心とした各種薬剤感受性について. *Jap. J. Antibiotics* 30:840-846.
- 伊予部志津子 1980. 薬剤耐性因子(R)の検出法, p. 22-33. 三橋 進(編), 薬剤感受性測定法, 薬剤耐性菌の理論と実際. 講談社, 東京.
- John, J. F. and McNeill, W. F. 1981. Characteristics of *Serratia marcescens* contain-

- ing a plasmid coding for gentamicin resistance in nosocomial infections. *J. Infect. Dis.* 143:810-817.
23. 上嶺頼啓, 酒徳治三郎 1983. 尿路 *Serratia* 感染症の統計的観察. 泌尿紀要 29: 401-410.
24. 川原 薫, 木村貞夫 1982. *Serratia marcescens* のアミノグリコシド耐性と伝達性プラスミドの研究. *Chemotherapy* 30:535-539.
25. Knothe, H., Kettner, M., Kopsová, D. and Krčmáry, V. 1977. R plasmids coding for gentamicin, tobramycin, and carbenicillin resistance in *Serratia*, *Klebsiella* and *Escherichia coli* strains from a single clinical source. *Chemotherapy* 23:37-43.
26. 熊本悦明 1981. 尿路感染症における複数菌感染症. 臨床と細菌 8: 141-150.
27. Madduri, S. D., Mauriello, D. A., Smith, L. G. and Seebode, J. J. 1976. *Serratia marcescens* and the urologist. *J. Urol.* 116: 613-615.
28. Maki, D. G., Henneken, C. G., Phillips, C. W., Shaw, W. V. and Bennett, J. V. 1973. Nosocomial urinary tract infection with *Serratia marcescens*: an epidemiologic study. *J. Infect. Dis.* 128:579-587.
29. 松原謙一 1976. プラスミドの伝達機構, p. 129-159. プラスミド, 分子レベルからみた微生物の遺伝. 講談社, 東京.
30. Medeiros, A. A. and O'Briain, T. F. 1969. Contribution of R factors to the antibiotic resistance of hospital isolates of *Serratia*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1968 p. 30-35.
31. Meynell, E. and Datta, N. 1967. Mutant drug resistant factors of high transmissibility. *Nature* 214:885-887.
32. Meynell, E., Meynell, G. G. and Datta, N. 1968. Phylogenetic relationships of drug resistance factors and other transmissible bacterial plasmids. *Bacteriol. Rev.* 32:55-83.
33. MIC 測定法改定委員会 1981. 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定再改定について. *Chemotherapy* 29:76-79.
34. 那須 勝, 斎藤 厚, 堀 恒雄, 岩永正明, 広田 正毅 1976. *Serratia* 感染症に関する臨床的研究. 最新医学 31: 1370-1375.
35. 那須 勝, 猪瀬勝彦, 中富昌夫, 森 信興, 斎藤 厚, 原 耕平 1977. 最近の臨床材料から分離された *Serratia marcescens* の化学療法剤感受性. *Chemotherapy* 25:397-404.
36. Nomura, M. 1967. Colicins and Related bacteriocins. *Ann. Rev. Microbiol.* 21:257-284.
37. Novick, R. P. 1969. Extrachromosomal inheritance in bacteria. *Bacteriol. Rev.* 33:210-263.
38. 冈所 明, 徳永周二, 庄田良中, 池田彰良, 島村 正喜, 平野章治, 大川光央, 久住治男 1983. 金沢大学泌尿器科における最近2年間(1980~1981年)の尿路感染症患者尿中分離菌について. 西日本泌尿 45: 1163-1176.
39. Olexy, V. M., Bird, T. J., Grieble, H. G. and Farrand, S. K. 1979. Hospital isolates of *Serratia marcescens* transferring ampicillin, carbenicillin, and gentamicin resistance to other gram-negative bacteria including *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 15:93-100.
40. Petrocheilou, V., Grinsted, J. and Richmond, M. H. 1976. R-plasmid transfer *in vivo* in the absence of antibiotic selection pressure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 10:753-761.
41. Petrocheilou, V., Richmond, M. H. and Bennett, P. M. 1977. Spread of a single plasmid clone to an untreated individual from a person receiving prolonged tetracycline therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 12:219-225.
42. Roe, E. and Lowbury, E. J. L. 1972. Changes in antibiotic sensitivity patterns of gram-negative bacilli in burns. *J. Clin. Path.* 25:176-178.
43. 酒井 茂, 西尾 彰, 熊本悦明 1983. *Serratia marcescens* による尿路感染症の関する臨床的研究 第2報 泌尿器科病棟における尿路感染症発症に関する疫学的検討. 日泌尿会誌 74: 485-502.
44. 酒井 茂, 熊本悦明 1983. *Serratia marcescens* による尿路感染症に関する臨床的研究 第1報 *Serratia marcescens* による尿路感染症の臨床的及び細菌学的検討. 日泌尿会誌 14: 467-484.
45. Shaberg, D. R., Alford, R. H., Anderson, R., Farmer III, J. J., Melly, M. A. and Schaffner, W. 1976. An outbreak of nosocomial infection due to multiply resistant *Serratia marcescens*; evidence of interhospital spread. *J. Infect. Dis.* 134:181-188.
46. Shaberg, D. R., Highsmith, A. K. and Wachsmuth, I. K. 1977. Resistance plasmid transfer by *Serratia marcescens* in urine. *Antimicrob. Agents Chemother.* 11:449-450.
47. Shaberg, D. R., Rubens, C. E., Alford, R. H., Farrar, W. E., Schaffner, W. and McGee, Z. A. 1981. Evolution of antimicrobial resistance and nosocomial infection. *Am. J. Med.* 70:445-448.
48. Shaefler, S., Winter, J., Catelli, A., Greene, J. and Tóharski, B. 1971.

- Specific distribution of R factors in *Serratia marcescens* strains isolated from hospital infections. *Appl. Microbiol.* 22:339-343.
49. Sheehy, R. J., Orr, C. and Curtiss III, R. 1972. Molecular studies on entry exclusion in *Escherichia coli* minicells. *J. Bacteriol.* 112:861-869.
50. 清水喜八郎, 奥住捷子, 人見照子, 長野百合子, 千葉房子, 千葉純江, 大塚正和, 坂上ノリ子 1974. セラチア感染症. 総合臨床 23: 1694-1701.
51. 清水保夫, 西浦常雄 1979. 留置カテーテルと尿路感染症. 医学のあゆみ 111: 959-966.
52. 梶崎弘幸, 高浪 満 1975. 制限エンドヌクレアーゼ—種類と特異性—. 蛋核酵 20: 915-919.
53. Tantulavanich, S., Oleky, V. M., Prasad, T. R., Bird, T. J., Talanda-Fath, C., Grieble, H. G. and Farrand, S. K. 1981. An R plasmid of broad host range, coding for resistance to nine antimicrobial agents endemic in gram-negative nosocomial isolates. *J. Med. Microbiol.* 14:371-380.
54. Traub, W. H., Kleber, I., Pühler, A. and Burkardt, H. J. 1976. Characterization of a nosocomially significant, multiple drug-resistant strain of *Serratia marcescens*. *Chemotherapy* 22:297-312.
55. Traub, W. H., Raymond, E. A. and Startzman, T. S. 1971. Bacteriocin (marcescin) typing of clinical isolates of *Serratia marcescens*. *Appl. Microbiol.* 21:837-840.
56. 友枝宗光 1973. 細菌性線毛の構造と機能(Ⅰ). 蛋核酵 18: 1063-1075.
57. Tompkins, L. S., Plorde, J. J. and Falkow, S. 1980. Molecular analysis of R-factors from multiresistant nosocomial isolates. *J. Infect. Dis.* 141:625-636.
58. 辻 明良, 小川正俊, 金子康子, 五島達智子 1980. 実験的菌交代現象に関する研究Ⅰ, *in vitro*: 大腸菌, 緑膿菌およびセラチアの混合培養系における実験条件の設定, および  $\beta$ -lactum 系抗菌剤添加による生菌数の変動. *Chemotherapy* 28:347-358.
59. Vervist, L., Vandepitte, J. and Vandeven, J. 1978. Activity of eight aminoglycosides against isolates of *Serratia marcescens* from four hospitals. *J. Antimicrob. Chemother.* 4:47-55.
60. Wilfert, J. N., Barrett, F. F., Ewing, W. H., Finland, M. and Kass, E. H. 1970. *Serratia marcescens*: biochemical serological, and epidemiological characteristics and antibiotic susceptibility of strains isolated at Boston City Hospital. *Appl. Microbiol.* 19:345-352.
61. Willetts, N. 1974. Mapping loci for surface exclusion and incompatibility on the F factor of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 118:778-782.
62. 柳田友道 1980. バッチャ培養における増殖経過, p. 241-265. 微生物科学 2 成長・増殖・増殖阻害. 学会出版センター, 東京.
63. Yoshimori, R., Roulland-Dussoix, D. and Boyer, H. W. 1972. R factor-controlled restriction and modification of deoxyribonucleic acid: restriction mutants. *J. Bacteriol.* 112:1275-1279.

## Fundamental Studies of Urinary Tract Infection with *Serratia*: Interaction between bacteria of different genera and spreading of R plasmid to *Serratia*

Chikao MASU

Department of Urology, Hiroshima University School of Medicine  
(Chairman: Prof. H. NIHIRA)

Mixed culture experiments of *Serratia* isolated from clinical specimens and *E. coli* were carried out in order to examine (1) how the growth curve of each strain is modified in the coexistent medium, (2) how the R plasmid in *E. coli* spreads to *Serratia* and (3) how the antibiotics affects the mode of spreading of the R plasmid. The results obtained were summarized as follows.

- 1) In the medium where increase of the population of bacterium attained to a stationary stage, the growth of another bacterium was suppressed, but did not stop. This indicates that, when grown in mixed culture, organisms of different genera interact with each other, but that each organism grows in a group along a growing curve distinct from that of the other.
- 2) The R plasmid was transferred to *Serratia* isolated from clinical specimens less frequently and the population of *Serratia* having received the R plasmid eventually increased to a lesser extent. Regarding the transfer of a different R plasmid to *Serratia* already harboring a R plasmid, if plasmid incompatibility was seen, the population of *Serratia* with the new R plasmid decreased with time in some cultures.
- 3) At the end of mixed culture of 24 hr, the population of *Serratia* having received the R plasmid cultured in the medium where *E. coli* grew to a stationary stage and *Serratia* was still growing, was larger than that in the medium where the situation was reverse.
- 4) In cultures containing gentamicin (GM), the sensitive strain to GM became extinct, aiding multiplication of the resistant strain to GM.
- 5) GM resistant *Serratia*, at a concentration below 10 cells/ml, was inoculated into broth containing GM, with GM sensitive *Serratia* at a concentration of about  $10^7$  cells/ml, the resistant cells frequently died. When GM resistant *Serratia* coexisted with GM sensitive *Serratia* at a concentration of about  $10^4$  cells/ml, the resistant cells were able to survive and multiply.

These observations indicate that *Serratia* remains alive in the environment containing antibiotics because *Serratia* itself is a strain resistant to antibiotics and that, therefore, the chance of mating with the strain harboring R plasmid increased in the selective pressure of antibiotics, facilitating R plasmid transfer to *Serratia*. It is suggested that *Serratia* having received R plasmid may survive selectively with the aid of antibiotics.